

明 細 書

1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸の製造法

技術分野

- [0001] 本発明は、プロピオン酸菌発酵を用いた1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸(以下DHNAともいう)の高濃度製造法とその培養物の風味改善技術に関する。

背景技術

- [0002] DHNAは、従来、染料、顔料及び感光材料として工業材料として有用であることが知られており、これまでも有機化学合成法により種々の合成法が開発されている。本発明者らは、これらに変わるDHNAの製造法について検討した結果、プロピオン酸菌により菌体内外に大量に産生されることを見出すと共に、この培養物から採取したDHNA含有組成物、又は1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸もしくはその塩には、乳糖不耐症の牛乳の摂取時にみられる腹部不快症状を低減する作用を有すること、代謝性骨疾患の予防治療に有用であることを見出した(特許文献1)。本法により、DHNAを飲食品や医薬品に用いることを可能にしたが、DHNA含有組成物は、風味の点で必ずしも満足のゆくものではなく、商品に多用することが困難であった。

特許文献1:国際公開第WO03/016544号パンフレット

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0003] 本発明の目的はプロピオン酸菌発酵による風味の改善されたDHNA含有組成物の効率的な製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0004] 本発明者は、苦みの抑制されたDHNA含有組成物を得るために各方面から鋭意検討した結果、全く意外にも、プロピオン酸菌発酵中の一定の時期に培地のエアレーションを行うことで、培養物中のDHNA濃度が高まるという有用な新知見を得た。また、培養後の培養物にプロピオン酸菌の炭素源を添加し、弱アルカリ条件下低温保存することによっても、培養が終了しているにもかかわらず、DHNA濃度が高まることを見出した。さらに、かくして得られたDHNA含有組成物は苦みが抑制され、風

味が良好であり飲食品や医薬品として有用であることを見出した。

[0005] すなわち、本発明は、プロピオン酸菌に属する1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸生産菌を嫌氣的条件下で培養を開始し、培地中の炭素源濃度が3. 5質量%以下になった時点で培地にエアレーションして培養することを特徴とする1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸の製造法を提供するものである。

また、本発明は、プロピオン酸菌に属する1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸生産菌を嫌氣的条件下で培養し、得られた培養物に炭素源を添加し、弱アルカリ下で3〜20℃に保存することを特徴とする1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸の製造法を提供するものである。

また、本発明は、プロピオン酸菌に属する1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸生産菌を嫌氣的条件下で培養を開始し、培地中の炭素源濃度が3. 5質量%以下になった時点で培地にエアレーションして培養し、得られた培養物に炭素源を添加し、弱アルカリ条件下で3〜20℃に保存することを特徴とする1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸の製造法を提供するものである。

また、本発明は前記の如くして得られた1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸含有組成物を提供するものである。

また、本発明は前記の如くして得られた1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸含有組成物を有効成分として含有する腹部不快症状改善用飲食品、腹部不快症状改善剤、代謝性骨疾患予防治療用飲食品又は代謝性骨疾患予防治療剤を提供するものである。

また、本発明は前記の如くして得られた1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸含有組成物の腹部不快症状改善用飲食品、腹部不快症状改善剤、代謝性骨疾患予防治療用飲食品又は代謝性骨疾患予防治療剤の製造のための使用を提供するものである。

さらにまた、本発明は前記の如くして得られた1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸含有組成物の有効量を投与することを特徴とする腹部不快症状の処置方法又は代謝性骨疾患の処置方法を提供するものである。

発明の効果

- [0006] 本発明によれば、DHNAが効率良く生産でき、かつ得られたDHNA含有組成物は風味が良好で飲食品、医薬品として有用である。

図面の簡単な説明

- [0007] [図1]エアレーションへの切替え時期を変化させた場合のDHNA濃度の変化を示す。
- [図2]エアレーションへの切替え時期を変化させた場合の乳糖濃度の変化を示す。
- [図3]エアレーションへの切替え時期とプロピオン酸菌数の変化を示す。
- [図4]エアレーションへの切替え時期を変化させた場合のプロピオン酸濃度を示す。
- [図5]エアレーションへの切替え時期を変化させた場合の酢酸濃度を示す。
- [図6]エアレーションの流量を変化させた場合のDHNA濃度を示す。

発明を実施するための最良の形態

- [0008] 本発明の製造法に用いられるプロピオン酸菌としては、DHNA産生菌であれば特に限定されないが、プロピオニバクテリウム属に属する菌が好ましく、例えばプロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ(*Propionibacterium freudenreichii*)、プロピオニバクテリウム・トエニー(*P. thoenii*)、プロピオニバクテリウム・アシディプロピオニシ(*P. acidipropionici*)、プロピオニバクテリウム・ジェンセニー(*P. jensenii*)などのチーズ用の菌、プロピオニバクテリウム・アビダム(*P. avidum*)、プロピオニバクテリウム・アクネス(*P. acnes*)、プロピオニバクテリウム・リンホフィラム(*P. lymphophilum*)、プロピオニバクテリウム・グラニュロサム(*P. granulosam*)などを挙げることができる。このうち、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒが好ましく、さらに*P. freudenreichii* IFO 12424及び*P. freudenreichii* ATCC 6207、*P. freudenreichii* ET-3(FERM P-18454)が特に好ましい。
- [0009] 本発明方法に用いる培地は、炭素源を含有する培地が好ましく、本発明における炭素源とは、プロピオン酸菌が資化できる炭素源をいう。例えば乳糖、ブドウ糖、乳酸、グリセロール、グルテン、セルロース等が挙げられ、特に乳糖が好ましい。培養開始前の培地中の炭素源含有量は4〜8質量%、さらに4〜7質量%、特に4〜6.7質量%が好ましい。このうち、炭素源として乳糖を含有させた培地としては、ホエイ粉、カゼイン、脱脂粉乳、或いはホエイを透析処理して乳糖含量を減らしたホエイ蛋白質濃

縮物、或いは乳糖含量を更に高純度に分離したホエイ蛋白質分離物が挙げられる。これらはそのまま、或いはプロテアーゼ処理して用いることも可能であり、酵母エキス、トリプチケース等のペプトンと、ブドウ糖、乳糖、乳糖のラクターゼ処理物等プロピオン酸菌が資化する炭素源となり得る単糖類及び／又は2糖類等の適量の糖類と、乳酸、グリセロール、グルテン、セルロース、乳清ミネラル等のミネラル分、必要に応じて牡蠣、生姜等ミネラル分を多く含む動植物性食品又はその抽出物を添加することにより培地を調製することができる。以下に、培地原料に脱脂粉乳のプロテアーゼ処理物を主成分とする培地調製法の一例を示す。

[0010] 脱脂粉乳を10〜20質量%になるように水で溶解し、温度を47℃に調整する。これにプロテアーゼを脱脂粉乳量の2.5質量%を添加し、脱脂粉乳溶液中のタンパク質を分解する。プロテアーゼとしては、動植物由来又は細菌由来のタンパク質分解酵素が挙げられ、酸性、中性、アルカリ性を問わず使用することができる。分解は6時間行い、分解中の温度は47℃、pHは6.8に調整する。pHの調整には炭酸カリウム水溶液を用いる。プロテアーゼによる分解が終了したら脱脂粉乳溶液を80℃に加温し、10分間保持することでプロテアーゼを失活させる。失活後に脱脂粉乳の質量濃度が10%となるように水でメスアップし、脱脂粉乳の1〜10質量%、好適には3〜7質量%のビール酵母エキスを添加した後、滅菌する。滅菌条件はオートクレーブを用いる場合が121℃で7分以上、滅菌プレートを用いる場合が140℃以上で4秒以上とする。こうして得られた培地中には通常4〜5質量%の乳糖が含まれている。

[0011] 培養は、嫌氣的条件下で行われる。嫌氣的条件は、例えば窒素ガス、ヘリウムガス、アルゴンガス、水素ガス、その他不活性ガスを1種又は2種以上組み合わせることが可能で、中でも窒素ガス又は炭酸ガス雰囲気下の条件とするのが好ましい。より具体的には、ファーメンター中に窒素ガス、炭酸ガス等を上面通気で流し、攪拌を行い、培地温度を33℃に調整する。培地温度が33℃で安定したら、プロピオン酸菌スターターを接種して嫌氣的条件下培養を開始する。スターターには、プロピオン酸菌の賦活培養液や、培養液の菌体濃縮物などが利用可能である。培地への添加量は、前者の場合培地に対して0.05%、後者の場合0.3%程度が目安となるが、これらの量は必要に応じて適宜変更してもかまわない。

- [0012] 培養温度は、20ー40℃、培地のpHは中性ー微酸性(好ましくはpH5.5ー7.5)の条件下で培養する。培養中の酸度上昇を抑制するには、炭酸カリウム水溶液、炭酸ナトリウム水溶液等、中和剤として知られている公知のものを使用することができる。
- [0013] 次に培地にエアレーションする方法について説明する。この手段によりDHNAの生産量が増大することは、驚くべきことである。エアレーションを継続的に行うことによりDHNAの生産量が増大する理由は明らかではないが、このエアレーションによって、プロピオン酸菌がプロピオン酸の消費を開始する。
- [0014] エアレーションを開始する時期は、培地中の炭素源濃度が3.5質量%以下になった時点であるが、プロピオン酸菌の炭素源が枯渇する24時間前が一つの目安になる。エアレーション開始時期は、さらに、炭素源濃度が1.0ー3.5質量%となった時点、特に1.5ー3.0質量%となった時点がより好ましい。炭素源濃度が3.5質量%以下になった時点でエアレーションすることでプロピオン酸菌は、炭素源に加えプロピオン酸も消費するようになり、最終的に炭素源はほぼ枯渇する。エアレーション開始時の培地中のプロピオン酸菌数は、 1.0×10^{10} cfu/mL (10.0 log cfu/mL)以上、さらに 1.4×10^{10} cfu/mL (10.1 log cfu/mL)以上が好ましい。こうすることにより、培地中の炭素源をほぼ枯渇させることができる。前述の乳糖含有培地及び培養条件では、培養開始後約48時間後に、乳糖濃度が3.5質量%以下になり、エアレーション開始時期となる。なお、乳糖、ブドウ糖といったプロピオン酸菌の炭素源となる糖類を途中添加する培養法も知られているが(例えば特許文献1、特開平10-304871号公報)、本発明においては、これら糖類を途中添加はせず枯渇させることが好ましい。
- [0015] エアレーションによる空気の供給量としては、プロピオン酸菌に刺激を与える程度の量が好ましい。この条件に相当する一例としてラボスケール(1.5L容量)での具体例を挙げると、スパージャーを使用し攪拌バネで150rpmの条件下培養を行う場合、空気の供給量は2L以上/分、より好ましくは2L/分ー4L/分であるが、容量、攪拌速度、装置等に合わせ適宜調整することができる。なお、液中の溶存酸素量が必要以上に高くなった場合には、プロピオン酸菌の生育が休止し、DHNAの産生も止

まる。前記の培地及び培養条件の場合、通常培養開始から約168時間で培養を終了する。

- [0016] エアレーションの方法としては、培地に多孔性の通気チューブを挿入して、チューブ全面で空気を送り込む方法や、スパージャーで気泡を送り込む方法が挙げられる。
- [0017] このようにして、培地及び菌体に蓄積されたDHNAは、培養を停止し、直ちにその培養物よりDHNAの採取に供することができる。また、培養の終点としては、菌数が定常期に達し、培地中の炭素源が枯渇してから3〜5日が目安となる。
- [0018] 次に、培養終了後の培養物にプロピオン酸菌の炭素源を添加し、弱アルカリ下で3〜20℃に保存してDHNAを製造する方法について説明する。ここで培養物は、前記のエアレーション後の培養物でもよいが、エアレーションを経由しない通常の嫌氣的又は微好氣的条件下による培養終了後の培養物でもよい。
- [0019] 培養物への炭素源添加量は、培養物中の炭素源濃度が0.2〜3.0質量%、さらに0.4〜2.5質量%、特に0.8〜2.2質量%となるよう設定することが好ましい。また、弱アルカリ下にするには、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、リン酸ナトリウム等の塩基を添加して培養物のpHが7〜9、特に7.5〜8.5になるようにするのが好ましい。また、保存温度は3〜20℃、特に3〜15℃、さらに5〜15℃が好ましい。保存期間は、1〜3週間、特に1〜2週間が好ましい。
- [0020] このような弱アルカリ下の低温保存により培養物中のDHNA含量が向上する。こうして、新たな設備を必要とせず、省スペースで、しかも保存中にDHNA量を増大できる本方法は極めて有用かつ効果的な製造法といえる。
- [0021] 次に、DHNAの採取方法について説明する。得られた培養物を吸着クロマトグラフィーに付すのが好ましい。吸着剤としては、活性炭や合成吸着剤（例えばダイアイオンHP-20、三菱化学(株)製）などの逆相系の吸着剤を広く使用することができる。まず、吸着剤をカラムに充填し、0.5% (w/v) アスコルビン酸ナトリウム水溶液で洗浄する。次いで、得られた培養物をカラムに添加し（通過液をpassとした）、さらに0.5% (w/v) アスコルビン酸ナトリウム水溶液で水溶性画分を除去する。その後、0.5% (w/v) 量アスコルビン酸ナトリウムを添加したエタノールで溶出し、このエタノール

溶出画分を濃縮することで、DHNAを高濃度に含む組成物を得ることができる。さらに、精製を行い、純粋なDHNA又はその塩を得ることができる。尚、カラムからのDHNAの溶出液としてエタノールの代わりにメタノール等の他のアルコールを用いてもよい。また、これに代わる方法として、培養物を遠心分離し回収した上澄み液から、液体クロマトグラフィーを用いてDHNAを分取することも可能である。なお、アスコルビン酸ナトリウムに代わり、エリスルビン酸ナトリウムを用いることも好ましく、これらは、DHNAの安定化剤として用いられるが、本発明では、アスコルビン酸、エリスルビン酸、これらの遊離の酸のほか、脂肪酸エステルその他各種のエステル類、アルカリ金属塩、その他の塩類も同様に使用することができる。

[0022] DHNAの塩としては、薬学的又は食品学的に許容できる塩が挙げられ、代表的な塩には、ナトリウム、カリウム、リチウム等の一価金属塩、マグネシウム、カルシウム、亜鉛等の多価金属塩、アンモニア、エタノールアミン等の無機あるいは有機アミン塩等が挙げられる。また、自体公知の反応を用いることにより、塩交換を行うこともできる。該塩としては、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭気水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩等が用いられるが、これらは例示であって、本発明はこれらの塩に限定されない。

[0023] DHNAは、DHNA産生菌の培養物中(菌体内及び／又は外)に含有されているので、吸着クロマトグラフィーを適用せずに培養物それ自体をロータリーエバポレーター等を使用し、濃縮することによってDHNAを高濃度に含有する組成物を得ることができる。また、通常遠心分離法によって培養物から菌体を分離し得られた上清を濃縮することも好ましい。こうして得られた組成物は、利用する形態にあわせ、液状のまま用いてもよいし、粉末状に加工することもできる。

[0024] かくして得られたDHNA含有組成物はDHNA濃度が高く、苦みが抑制され、風味が良好である。従って、本発明のDHNA含有組成物、又はDHNAもしくはその塩は、飲食用又は医薬品いずれの形態でも利用することができ、例えば、医薬品として直接投与することにより、或いは特定保健用食品等の特別用途食品、栄養機能食品として直接摂取することにより、あるいはまた、各種食品(牛乳、清涼飲料、発酵乳、ヨ

ーグルト、チーズ、パン、ビスケット、クラッカー、ピッツァクラストその他)に添加しておき、これを摂取することによって、腸内フローラの改善や牛乳の摂取時にみられる腹部不快症状の低減、代謝性骨疾患の予防治療することができる。

[0025] 前記食品を製造するために、主成分として、水やタンパク質、糖質、脂質、ビタミン及びミネラル類、有機酸、果汁、フレーバー類等を組み合わせることができる。例えば、全脂粉乳、脱脂粉乳、部分脱脂粉乳、カゼイン、ホエイ粉、ホエイタンパク質、ホエイタンパク質濃縮物、ホエイタンパク質分離物、 α -カゼイン、 β -カゼイン、 β -ラクトグロブリン、 α -ラクトアルブミン、ラクトフェリン、大豆タンパク質、鶏卵タンパク質、肉タンパク質等の動植物性タンパク質、これら加水分解物、バター、乳清ミネラル、クリーム、ホエイ、非タンパク態窒素、シアル酸、リン脂質、乳糖等の各種乳由来成分；蔗糖、ブドウ糖、果糖、糖アルコール類、麦芽糖、オリゴ糖類、化工澱粉(デキストリンのほか、ソリュブルスターチ、プリティッシュスターチ、酸化澱粉、澱粉エステル、澱粉エーテル等)、食物繊維等の炭水化物；ラード、魚油などの動物性油脂；パーム油、サフラワー油、コーン油、ナタネ油、ヤシ油等の植物性油脂、これらの分別油、水添油、エステル交換油等の植物性油脂；ビタミンA、ビタミンB群、ビタミンC、エリソルビン酸、ビタミンD群、ビタミンE、ビタミンK群、ビタミンP、ビタミンQ、ナイアシン、ニコチン酸、パントテン酸、ビオチン、イノシット、コリン、葉酸などの各種ビタミン；カルシウム、カリウム、マグネシウム、ナトリウム、塩素、銅、鉄、マンガン、亜鉛、セレン、フッ素、ケイ素、ヨウ素等のミネラル；リンゴ酸、クエン酸、乳酸、酒石酸等の有機酸や有機酸塩などがあげられ、これらから選択される1種又は2種以上を適宜選択して添加することができる。これら各種成分は合成品の他、必要に応じこれらを多く含む食品で添加することも望ましい。また、その形態としては、前記食品に限らず、最終製品で活性が維持されていれば特に限定されることなく、液状、固形状(顆粒、粉末、タブレット、ゲル状を含む)、半固形状(ゼリー状を含む)、ペースト状、乳化状等のいずれでもよい。

[0026] 本発明に係る組成物、又はDHNAもしくはその塩を医薬品として使用する場合には、種々の形態で投与することができる。その形態として、例えば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与をあげることができる。これらの各種製

剤は、常法に従って主剤に賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、矯味、矯臭剤、溶解補助剤、懸濁剤、コーティング剤などの医薬の製剤技術分野において通常使用しうる既知の補助剤を用いて製剤化することができる。

実施例

[0027] 以下、試験例、実施例を挙げ本発明を説明するが、本発明はこれにより限定されるものではない。なお、以下の試験例及び実施例においてDHNAの定量はWO03/016544第9頁に記載の方法に従って行った。乳糖濃度の測定は、乳糖電極を用いたフローインジェクション分析法(王子計測機器(株)製、フローインジェクション分析装置、Bio Flow Analyzer(商品名)使用)によって行った。プロピオン酸菌数の測定は、BL寒天培地で行った。プロピオン酸、酢酸濃度は、HPLC法(カラム:RS pak KC-811+プレカラムKC-G、検出:UV445nm)で測定した。

[試験例1]エアレーション切替え時期の検討

(1)培地の調製

[0028] 脱脂粉乳(明治乳業(株)製)150gを水1000gに溶解し、温度を47℃に調整した。これにプロテアーゼを3.75g添加して47℃で6時間タンパク質の分解を行った。タンパク質分解中のpHは6.6〜6.8に炭酸カリウム溶液を用いて調整した。タンパク質分解後、80℃まで加温し10分保持することでプロテアーゼを失活させ、ビール酵母エキスを7.5g添加し、炭酸カリウム水溶液を用いてpHを6.95に調整した。水で溶液の容量を1500mLに調整し、2L容量のファーマンターに入れ、培地滅菌を行った。滅菌条件は121℃、7分とした。

(2)培養条件

[0029] ファーマンター中に窒素ガスを通気し、培地温度を33℃で安定させて、凍結濃縮スターター(*P. freudenreichii* ET-3)を0.75mL添加し、培養を開始した。発酵中の温度は33℃、pHは6.5に調整し、窒素ガスを通気した。pHの調整は40%(wt/wt)の炭酸カリウム水溶液を使用した。培養方法としては、以下の5種類を実施した。

- 1) 培養開始から終了まで窒素ガス通気を継続、
- 2) 培養開始から72時間後、96時間後に培養液の2%重量の乳糖を添加する以外は1)と同様、

3) 培養開始から24時間後に窒素ガス通気をエアレーション(2L/分)に切替え、
4) 培養開始から48時間後にエアレーション(2L/分)に切替え、
5) 培養開始から72時間後にエアレーション(2L/分)に切替え、
これらはすべて培養開始168時間後に培養を終了した。

(3) 結果

[0030] DHNA濃度、乳糖濃度、プロピオン酸菌数、プロピオン酸濃度、酢酸濃度の経時変化をそれぞれ図1、図2、図3、図4、図5に示す。この結果から明らかなように、4)、5)により得られた培養物は、DHNAの濃度が約45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となった(図1)。また、4)、5)において、96時間後に乳糖がほぼ枯渇し(図2)、培養開始から増加していたプロピオン酸濃度も緩やかに減少することが確認された(図4)。プロピオン酸菌数は、3)を除き、培養終了時にはすべて $1.0 \times 10^{10} \text{cfu}/\text{mL}$ (10.0 log cfu/mL)を越え、4)、5)は、ほぼ $1.0 \times 10^{11} \text{cfu}/\text{mL}$ (11.0 log cfu/mL)に達していた(図3)。

[0031] 以上より、培養開始から少なくとも48時間経過した後に窒素通気からエアレーションに切替えることで、DHNAが高濃度に含まれる培養物が得られることが確認された(図6)。また、切替え時の乳糖濃度は、4)が3.3質量%、5)が2.9質量%であった(図2)。

[試験例2] エアレーション量の検討

[0032] エアレーション量を変更する以外は、試験例1の5)と同様の条件で、培養を行った。発酵開始から72時間後に0.5L/分、1.0L/分、2.0L/分、4.0L/分にエアレーションの流量を変更し培養を行った。その結果、流量を2.0/分以上とすることで、培養開始から144時間後にDHNA濃度が約40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となることがわかった。

[実施例1]

[0033] 脱脂粉乳(明治乳業(株)製)180gを水1000gに溶解し、温度を47°Cに調整した。これにプロテアーゼを3.75g添加して47°Cで3時間タンパク質の分解を行った。タンパク質分解中のpHは6.6〜6.8に炭酸カリウム水溶液を用いて調整した。タンパク質分解後に80°Cまで加温し10分保持することでプロテアーゼを失活させ、ビール酵母エキス7.5g、乳糖15gを添加し、炭酸カリウム水溶液を用いてpHを6.95に調整

した。水で溶液の容量を1500mLに調整し、2L容量のフーメンターに入れ、培地滅菌を行った(乳糖濃度質量約6.1%)。滅菌条件は121℃、7分とした。滅菌後、フーメンター中に窒素ガスを通気し、培地温度を33℃で安定させて、凍結濃縮スターター(*P. freudenreichii* ET-3)を0.75mL添加し、培養を開始した。培養中の温度は33℃、pHは6.5に調整し、窒素ガスを通気した。pHの調整には40%(wt/wt)の炭酸カリウム水溶液を使用した。培養開始72時間後に窒素ガスの通気からエアレーションに切替え、培養開始168時間後に培養を終了した。エアレーション時の空気流量は、2L/分、攪拌速度は、150rpmとした。この結果、DHNAの濃度が52 $\mu\text{g/mL}$ となる培養物が得られた。72時間後の乳糖濃度は約1.9質量%、プロピオン酸菌数は $3.5 \times 10^{10}\text{cfu/mL}$ であった。

[実施例2]

- [0034] 脱脂粉乳(明治乳業(株)製)120kgを水750kgに溶解し、温度を47℃に調整した。これにプロテアーゼを2.5kg添加し、pHを7.6に調整し47℃で3時間タンパク質の分解を行った。分解終了後に80℃まで加温し10分保持することでプロテアーゼを失活させ、ビール酵母エキス5kg、乳糖10kgを添加し、140℃、4秒で培地滅菌した。滅菌開始前の培地pHは6.9であった。滅菌後、水で培地量を1000Lに合わせ(乳糖濃度約6.1質量%)、フーメンター中に窒素ガスを20L/分で通気し、培地温度を33℃で安定させて、スターター(*P. freudenreichii* ET-3)を3.0L添加した。発酵中の温度は33℃、pHは6.5に調整し、窒素ガスを通気した。pHの調整は23%(wt/wt)の炭酸カリウム水溶液を使用した。培養開始72時間後に窒素ガスの通気からエアレーションに切替えて、培養開始168時間後に培養を終了した。エアレーション時の空気流量は200L/分、攪拌速度は52rpmとした。この結果、DHNAの濃度が42 $\mu\text{g/mL}$ となる培養物が得られた。なお、培養開始72時間後の乳糖濃度は約1.5質量%、プロピオン酸菌数は $3.0 \times 10^{10}\text{cfu/mL}$ であった。

[実施例3]

- [0035] 前記実施例2で得られたDHNA含有培養物に、アスコルビン酸ナトリウムを1.0%、乳糖を2.0%添加して、pHを8.0に調整してから、10℃で2週間保存した結果、DHNA濃度が55 $\mu\text{g/mL}$ となった。

また、乳糖をブドウ糖に替え、同様にして保存したところ、培養終了時よりDHNA濃度が増加した。

[比較例]

[0036] 培養中、エアレーションに切り替えず、窒素ガス通気を継続する以外は、実施例1とすべて同様の条件で行った。この結果、DHNAの濃度が $32\mu\text{g/mL}$ となる培養物が得られた。

[実施例4]

[0037] 前記実施例1で得られたDHNA含有培養物を120gのプレーンヨーグルト(明治乳業(株)製)に加え、調製したヨーグルトの官能評価を表1及び表2に示す。本発明法により得られたDHNA含有培養物を加えたヨーグルトは、DHNA濃度が高く、従来法(プレーンヨーグルトに比較例で得られたDHNA含有培養物を添加したもの)と比較し、酸味がなく、苦みも感じられないことが確認された。

[0038] [表1]

項目	風味	酸味	苦味	総合評価
実施例1で調製した培養物	○	○	-	◎
比較例で調製した培養物	○	○	×	△

×:不良 △:やや不良 ○:普通 ◎優良 -:感じない

プレーンヨーグルトに1g添加
プレーンヨーグルト:120g

[0039] [表2]

項目	風味	酸味	苦味	総合評価
実施例1で調製した培養物	△	○	-	○
比較例で調製した培養物	△	△	×	×

×:不良 △:やや不良 ○:普通 ◎優良 -:感じない

プレーンヨーグルトに2g添加
プレーンヨーグルト:120g

[0040] [実施例5]

[0041] 脱脂粉乳(明治乳業(株)製)120kgを水750kgに溶解し、温度を47℃に調整した

。これにプロテアーゼを2.5kg添加し、pHを7.6に調整し47℃で6時間タンパク質の分解を行った。分解終了後に80℃まで加温し10分保持することでプロテアーゼを失活させ、ビール酵母エキス5kg、乳糖10kgを添加し、140℃、4秒で培地滅菌した。滅菌開始前の培地pHは6.9であった。滅菌後、水で培地量を1000Lに合わせ(乳糖濃度約6.1質量%)、ファーメンター中に窒素ガスを20L/分で通気し、培地温度を33℃で安定させて、スターター(*P. freudenreichii* ET-3)を3.0L添加した。培養中の温度は33℃、pHは6.5に調整し、窒素ガスを通気した。pHの調整は23%(wt/wt)の炭酸カリウム水溶液を使用した。培養開始72時間後に窒素ガスの通気からエアレーションに切替えて、培養開始168時間後に培養を終了した。エアレーション時の空気流量は200L/分、攪拌速度は52rpmとした。この結果、DHNAの濃度が48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となる培養物が得られた。なお、培養開始72時間後の乳糖濃度は約3.0質量%、プロピオン酸菌数は $2.9 \times 10^{10} \text{cfu}/\text{mL}$ であった。

[実施例6]

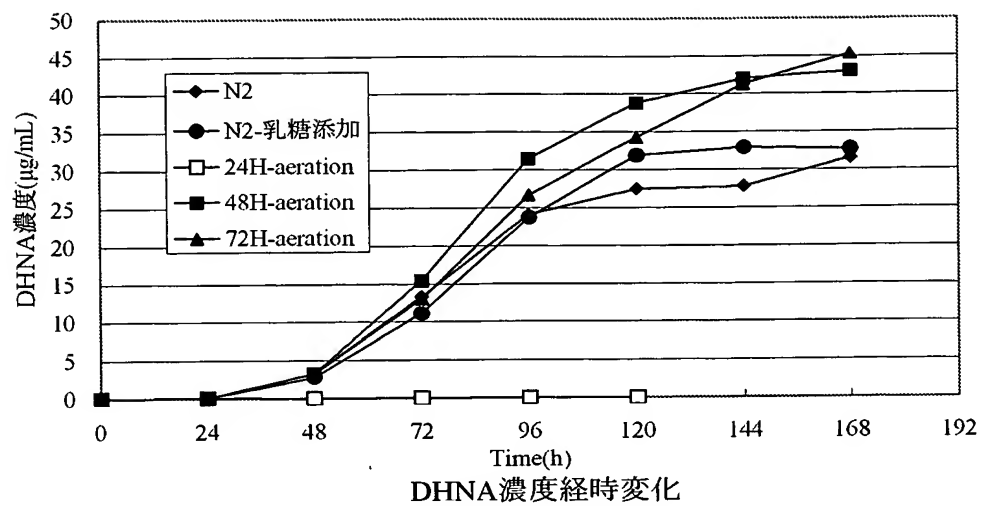
- [0042] 前記実施例5で得られたDHNA含有培養物に、アスコルビン酸ナトリウムを1.0%、乳糖を1.0%添加して、pHを8.0に調整してから、10℃で2週間保存した結果、DHNA濃度が60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となった。

請求の範囲

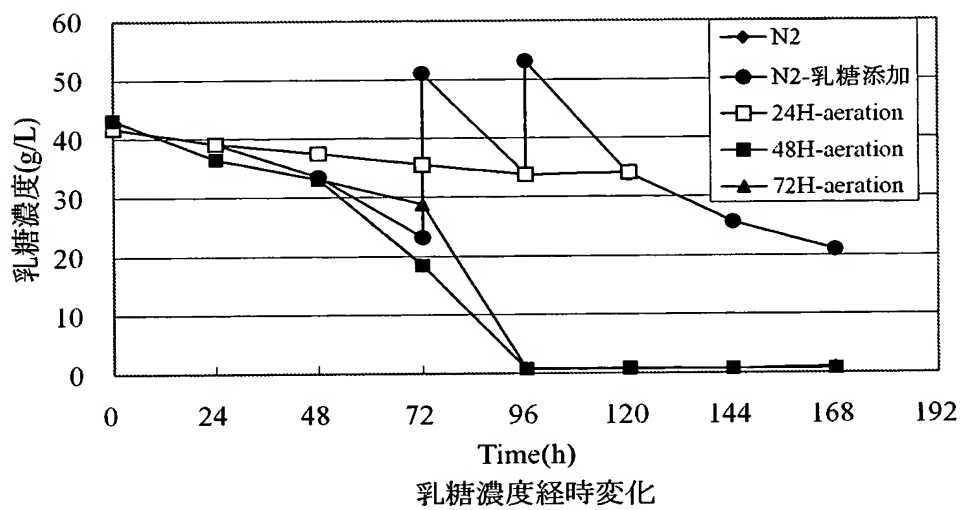
- [1] プロピオン酸菌に属する1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸生産菌を嫌氣的条件下で培養を開始し、培地中の炭素源濃度が3. 5質量%以下になった時点で培地にエアレーションして培養することを特徴とする1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸の製造法。
- [2] 培地が、炭素源4〜8質量%を含有する培地である請求項1記載の製造法。
- [3] 嫌氣的条件が、窒素ガス又は炭酸ガス雰囲気下の条件である請求項1又は2記載の製造法。
- [4] プロピオン酸菌に属する1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸生産菌を嫌氣的条件下で培養し、得られた培養物に炭素源を添加し、弱アルカリ下で3〜20℃に保存することを特徴とする1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸の製造法。
- [5] 培養物への炭素源添加量が、培養物中の炭素源濃度が0. 2〜3質量%となる量である請求項4記載の製造法。
- [6] 保存が、培養物のpHを7〜9とし、3〜20℃で1週間〜3週間保存するものである請求項4又は5記載の製造法。
- [7] プロピオン酸菌に属する1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸生産菌を嫌氣的条件下で培養を開始し、培地中の炭素源濃度が3. 5質量%以下になった時点で培地にエアレーションして培養し、得られた培養物に炭素源を添加し、弱アルカリ条件下で3〜20℃に保存することを特徴とする1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸の製造法。
- [8] 培地が、炭素源4〜8質量%を含有する培地である請求項7記載の製造法。
- [9] 嫌氣的条件が、窒素ガス又は炭酸ガス雰囲気下の条件である請求項7又は8記載の製造法。
- [10] 培養物への炭素源添加量が、培養物中の炭素源濃度が0. 2〜3質量%となる量である請求項7〜9のいずれか1項記載の製造法。
- [11] 保存が、培養物のpHを7〜9とし、3〜20℃で1週間〜3週間保存するものである請求項7〜9のいずれか1項記載の製造法。
- [12] 請求項1〜11のいずれか1項記載の製造法により得られた1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸含有組成物。

- [13] 請求項12記載の組成物を有効成分として含有する腹部不快症状改善用飲食品。
- [14] 請求項12記載の組成物を有効成分として含有する腹部不快症状改善剤。
- [15] 請求項12記載の組成物を有効成分として含有する代謝性骨疾患の予防治療用飲食品。
- [16] 請求項12記載の組成物を有効成分として含有する代謝性骨疾患予防治療剤。
- [17] 請求項12記載の組成物の腹部不快症状改善用飲食品製造のための使用。
- [18] 請求項12記載の組成物の腹部不快症状改善剤製造のための使用。
- [19] 請求項12記載の組成物の代謝性骨疾患予防治療用飲食品製造のための使用。
- [20] 請求項12記載の組成物の代謝性骨疾患予防治療剤製造のための使用。
- [21] 請求項12記載の組成物の有効量を投与することを特徴とする腹部不快症状の処置方法。
- [22] 請求項12記載の組成物の有効量を投与することを特徴とする代謝性骨疾患の処置方法。

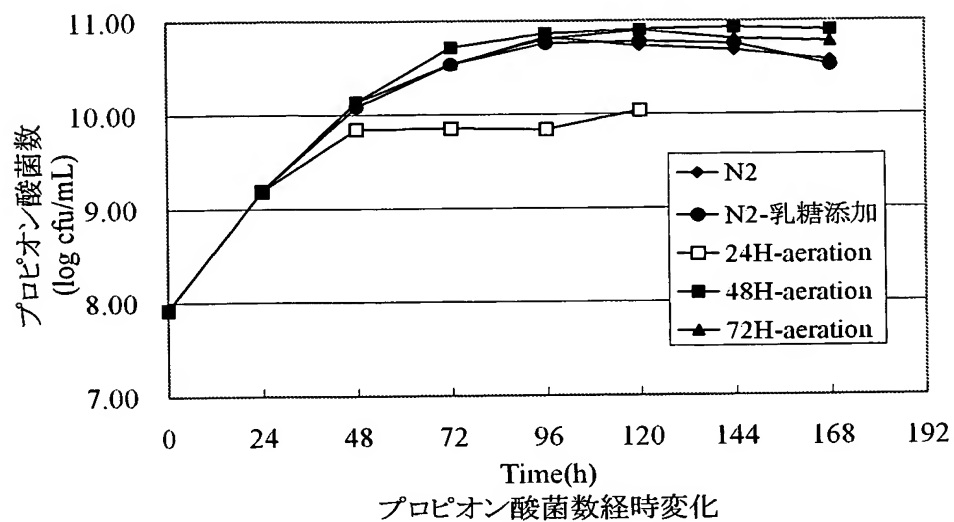
[図1]



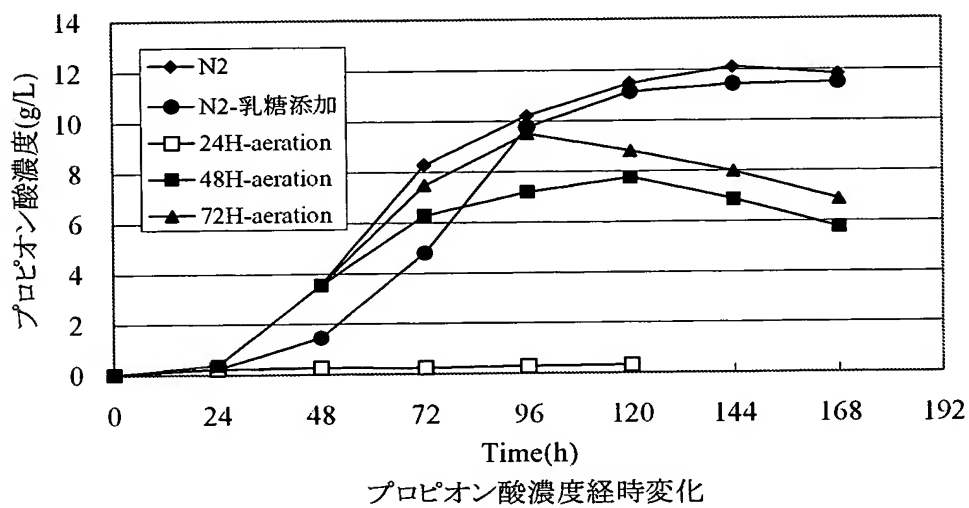
[図2]



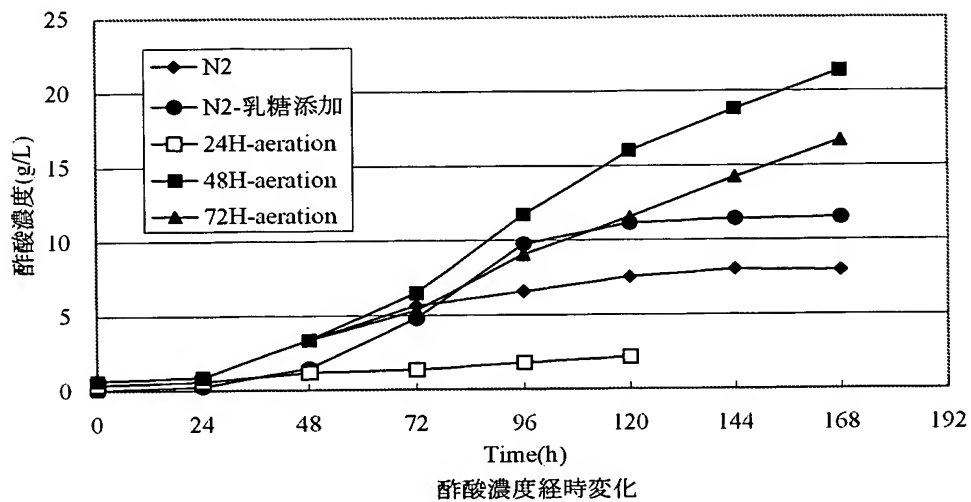
[図3]



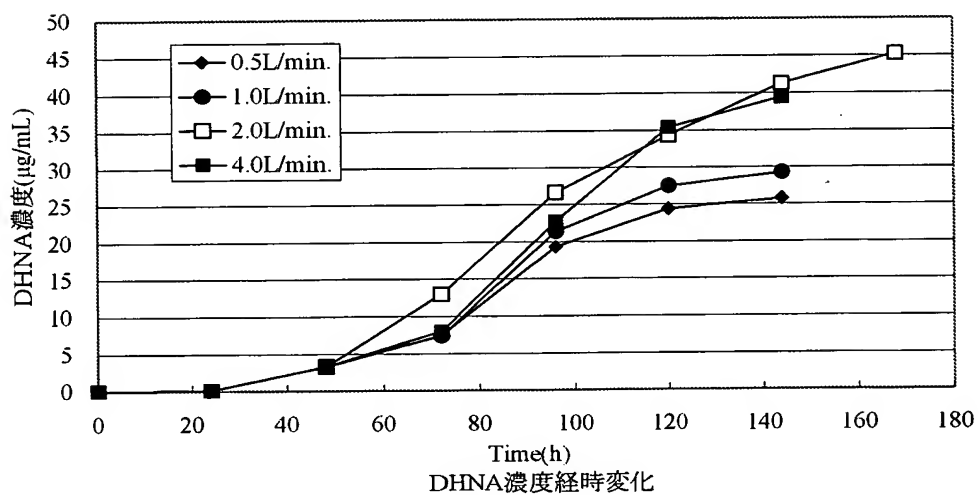
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014394

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12P7/42, A61K31/192, A61P19/08, A23L1/30, A23C9/152

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12P7/42, A61K31/192, A61P19/08, A23L1/30, A23C9/152

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> <u>Y</u>	WO 03/016544 A1 (Meiji Milk Products Co., Ltd.), 27 February, 2003 (27.02.03), & EP 1416052 A & JP 2003-521851 A & US 2004/241815 A1	<u>12-20</u> <u>1-11</u>
Y	ISAWA K et al., Isolation and Identification of a New Bifidogenic Growth Stimulator Produced by Propionibacterium freudenreichii ET-3., Biosci.Biotechnol.Biochem. (2002), Vol.66, No.3, pages 679 to 681	1-20
Y	YE K et al., Efficient Production of Vitamin B12 from Propionic Acid Bacteria under Periodic Variation of Dissolved Oxygen Concentration, J.Ferment.Bioeng. (1996), Vol.82, No.5, pages 484 to 491	1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 January, 2005 (11.01.05)

Date of mailing of the international search report

01 February, 2005 (01.02.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014394

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Ken'ichiro MIYANO et al., "Propion-sankin no Roka Baiyo Oyobi Shuki Seigyo Baiyo ni yoru Vitamin B12 no Seisan", The Society of Chemical Engineers, Japan Shuki Taikai Kenkyu Happyo Koen Yoshishu (1997), Vol.30th, separate volume 1, page 316	1-20
Y	JP 2002-540760 A (DSM N.V.), 03 December, 2002 (03.12.02), & WO 00/37669 A3 & EP 1144670 A2 & US 6492141 B1	1-20
Y	Jun ISHIDA et al., "Propion-sankin no Kenki Oyobi Koki Baiyo ni yoru Bifidobacteria Tokuiteki Zoshoku Sokushin Busshitsu no Seisan", 2002 Nendo (Heisei 14 Nendo) Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry Taikai Koen Yoshishu (2002), page 8	1-20
Y	ES 2102332 A (INVEST Y DESARROLLO AGROINDUST), 16 July, 1997 (16.07.97), & ES 2122927 A1	1-20
Y	Yoshikiyo OKADA et al., "Propion-sankin ni yoru Nyusei Hakkobutsu Seibun no DHNA no DSS Choen ni Taisuru Koensho Sayo no Kento", Digestive organ and immunology, 10 June, 2003 (10.06.03), No.40, pages 58 to 60	1-20
A	Ken'ichi HOJO et al., Bifidogenic Growth Stimulator Produced by Propionic Acid bacteria., Milk Science (2000), Vol.49, No.3, pages 161 to 167	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014394

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 21, 22
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 21 and 22 involve methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12P7/42, A61K31/192, A61P19/08, A23L1/30, A23C9/152

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12P7/42, A61K31/192, A61P19/08, A23L1/30, A23C9/152

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	WO 03/016544 A1 (明治乳業株式会社) 2003. 02. 27 & EP 1416052 A & JP 2003-521851 A & US 2004/241815 A1	12-20 1-11
Y	ISAWA K, et. al., Isolation and Identification of a New Bifidogenic Growth Stimulator Produced by Propionibacterium freudenreichii ET-3., Biosci Biotechnol Biochem (2002), Vol. 66, No. 3, p. 679-681	1-20

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 01. 2005

国際調査報告の発送日

01. 2. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高 美葉子

4N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	YE K, et.al., Efficient Production of Vitamin B12 from Propionic Acid Bacteria under Periodic Variation of Dissolved Oxygen Concentration., J Ferment Bioeng(1996), Vol. 82, No. 5, p. p. 484-491	1-20
Y	宮野憲一郎, 他, プロピオン酸菌のろ過培養および周期制御培養によるビタミンB12の生産, 化学工学会秋季大会研究発表講演要旨集(1997), Vol. 30th, 第1分冊, p. 316	1-20
Y	JP 2002-540760 A(デー・エス・エム・ナムロー・フェノートシヤップ) 2002. 12. 03 & WO 00/37669 A3 & EP 1144670 A2 & US 6492141 B1	1-20
Y	石田淳也 他, プロピオン酸菌の嫌気および好気培養によるビフィズス菌特異的増殖促進物質の生産, 2002年度(平成14年度)日本農芸化学会大会講演要旨集(2002), p. 8	1-20
Y	ES 2102332 A(INVEST Y DESARROLLO AGROINDUST) 1997. 07. 16 & ES 2122927 A1	1-20
Y	岡田義清, 他, プロピオン酸菌による乳糖醗酵物成分のDHNAのDSS腸炎に対する抗炎症作用の検討, 消化器と免疫(2003年6月10日), No. 40, p. 58-60	1-20
A	Kenichi HOJO, et.al., Bifidogenic Growth Stimulator Produced by Propionic Acid bacteria., Milk Science(2000), Vol. 49, No. 3, p. 161-167	1-20

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 21、22 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲21、22は、ヒトの身体の治療による処置方法を含むものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。